昆 虫 学 报 *Acta Entomologica Sinica*，August 2002，45（4）：538－543 ISSN 0454-6296

AFLP 标记的特点及其在昆虫学研究中的应用

张民照，康　乐*
（中国科学院动物研究所，北京　100080）

摘要：扩增片段长度多态性（AFLP）是一种新兴的很有效的分子遗传标记方法，它通过对基因组 DNA 限制性内切酶酶切片段进行选择性扩增而揭示多态性，具有快速、经济简便、不需要预先知道模板 DNA 的信息、模板需要量少、重复性高、结果可靠及具有很高的信息含量等优点。AFLP 也具有缺点，主要是标记是显性的，同其他显性标记一样，不能区分杂合体和纯合体，因而不能更好地估算种群遗传的变异，对种群遗传结构的分析不能提供更多的统计信息；AFLP 技术较复杂，而且经常使用放射性同位素，对模板 DNA 质量要求也较高。为了克服 AFLP 的这些缺点，人们又在其基础上发展了其他相关技术，例如 AFRP、SAMPL、DALP 和 TE-AFLP 等。目前 AFLP 在昆虫方面的应用还不是很多，处于初级阶段，主要应用在生态型鉴定、种群遗传分析、连锁图谱构建等方面，相信随着其技术的发展完善，必将会越来越多地应用于昆虫学的研究中。

关键词：昆虫；AFLP；分子遗传标记
中图分类号：Q966　　**文献标识码**：A　　**文章编号**：0454-6296（2002）04-0538-06

Amplified fragment length polymorphism（AFLP）and its applications in entomological research

ZHANG Min-Zhao，KANG Le*（Institute of Zoology，Chinese Academy of Sciences，Beijing　100080，China）

Abstract: Amplified fragment length polymorphism（AFLP）is a new and powerful molecular genetic marker for DNA fingerprinting based on selective amplification of total DNA restriction fragments. AFLP is a fast and economic technique. It needs little template DNA for analysis and can generate fingerprints of any DNA without much prior sequence knowledge. Data produced by AFLP are reproducible，reliable and highly informative. However，AFLP has some disadvantages. AFLP markers are dominant，and thus can not distinguish heterogeneous loci from homologous loci. Therefore，they provide less precise estimates of population genetic variability and have limited statistical power for detecting population genetic structure. Technically，AFLP is quite complicated and often involves the use of radioactive isotopes. Also，AFLP requires the high quality template DNA. In order to overcome these limitations，some related and improved methods have been developed，such as AFRP，SAMPL，DALP and TE-AFLP. So far，the application of AFLP technique in entomology is in its infancy. It has been mainly used in the identification of biotypes，analyses of population genetics and construction of linkage genetic maps. With further improvement of this technique，it will be more widely employed in entomology.

Key words: insect；AFLP；molecular genetic marker

扩增片段长度多态性（amplified fragment length polymorphism，AFLP）是一种很有效的 DNA 分子标记方法，当初是为了在构建染色体连锁图谱研究中能够获得高密度 DNA 标记而发明的，此技术是 Zabeau 和 Vos（1993）的发明专利，自其发明之后，就被大量地应用在植物、动物研究中（Ulrich，1999）。

1　AFLP 的原理

AFLP 是通过对基因组 DNA 限制性内切酶酶切片段进行选择性扩增而揭示多态性。它把限制片长多态性（RFLP）技术和聚合酶链反应（PCR）技术结合起来，既具有 RFLP 技术的可靠性又具有 PCR 技术的高效性和简易性。AFLP 是用 PCR 扩增酶切

基金项目：国家基金委重点项目（39430030）
第一作者简介：张民照，男，1965 年 2 月生，博士，从事分子生态学研究
* 通讯作者 Author for correspondence，E-mail：lkang@panda.ioz.ac.cn
收稿日期 Received：2001-07-06；接受日期 Accepted：2002-02-09

后的片段来检测扩增片段多态性的，而不是 RFLP 用 southern 杂交来检测酶切基因组 DNA 后的片段多态性。它与随机扩增多态 DNA（RAPD）相似，检测的是片段的有无，因此多数 AFLP 标记与 RAPD 相似是显性的，不可能立即推断出某一位点是杂合体还是纯合体（Loxdale *et al.*，1998）。

AFLP 技术首先是对基因组 DNA 进行酶切，但是酶切方法又与 RFLP 不同，它用两种限制性内切酶，一种是密切酶（common cutter），识别位点常是 4 个碱基，对某 DNA 片段来说可以有较密集的酶切识别位点，可把 DNA 切割成较多的片段；另一种是稀切酶（rare cutter），识别位点常是 6 个碱基，对某 DNA 片段来说可以有较稀少的酶切识别位点，可把 DNA 切割成较少的片段。两种内切酶对 DNA 酶解后，基因组 DNA 被切割成两端分别带有两种酶粘性末端的一系列片段。选择两种切点数目不同的酶的原因是：如果选择两种密切酶，会产生很多的 AFLP 片段而难以分析，如果选择两种稀切酶产生的 AFLP 片段可能会极少而使 AFLP 分析失败。密切酶由于切点多，可产生较小的 DNA 片段，小片段能够用 PCR 进行扩增，并且片段在此大小范围内能够用测序凝胶分离；由于只有两种酶同时切割的 DNA 片段才能被扩增，因此 PCR 扩增的片段数目取决于稀切酶，应用稀切酶可减少基因组 DNA 酶切的 DNA 片段，从而减少 PCR 扩增所需要的模板片段，这样可以限制选择性扩增的所需选择性核苷酸的数目，利用较少的引物进行扩增，降低 AFLP 分析时间和成本；使用两种内切酶可对 PCR 双链产物中的一条进行放射性标记，从而防止了由于扩增产物两条链在凝胶中迁移不同步而产生的重影（doublets）；用两种内切酶酶切基因组 DNA 可以有最大自由度来调整所要扩增片段的数目；可以用较少的引物来显示较大的多态性（Vos *et al.*，1995）。

酶切后用连接酶把含有两种内切酶粘形末端的接头连接到基因组 DNA 片段上，两种接头都含有两部分序列：核心序列和内切酶识别序列（实际是内切酶的粘形末端序列），接头序列可与 AFLP 引物互补。AFLP 引物含有 3 个部分：核心序列、内切酶识别序列和选择延伸序列，前两部分序列可与接头互补。对大多数 DNA 来说，如果仅用与接头序列互补的序列作 AFLP 引物会扩增出大量的片段而难以分析，因此在 AFLP 引物的 3′末端加上几个核苷酸作为选择延伸序列，使 PCR 扩增具有选择性，只有与选择延伸序列互补的 DNA 才能扩增，所扩增的片段数由引物中延伸序列的核苷酸数目来调节，对较小的和简单的基因组来说可使用较短的或者不用选择延伸序列，对较复杂的基因组就使用较长的选择延伸序列。通常 AFLP 扩增分两次，第一次是预扩增（preamplification），然后用预扩增的产物为模板再次扩增。预扩增是使用含有一个核苷酸的选择延伸序列的引物，预扩增后的扩增使用的引物含有 3 个核苷酸的选择延伸序列。使用预扩增的优点是可以提高扩增特异性，降低 AFLP 图谱的弥散背景；可使扩增带数有所减少；再者是提供了大量的模板 DNA。AFLP 的一个引物的 5′端通常用放射性同位素或化学发光试剂进行标记，扩增后的产物通过测序凝胶进行分离（Vos *et al.*，1995，1997）。经过以上步骤，可以把基因组 DNA 酶切后的片段分离开来，并展示这些片段的多态性。

2 AFLP 用作分子遗传标记的优缺点

AFLP 用作分子遗传标记的优点主要有下列几点（Vos *et al.*，1997；Muller *et al.*，1999）。1）AFLP 技术基于 PCR，因此快速、经济简便，可同时对随机分布在染色体上的许多不同的 DNA 区域（多位点）进行分析。在试验条件优化后，一个研究者可以在一个月内分析几千个位点，而 30% 的位点是多态的。2）同 RAPD 一样，不需要预先知道所要扩增 DNA 的序列，适合对遗传背景不多的种类进行分析。不论来源和复杂性如何，任何 DNA 都可得到 AFLP 的指纹图谱。再者 AFLP 模板需要的数量较少，即使部分降解的样本仍然可以使用，因此 AFLP 可以应用到大型或小型的昆虫中，在昆虫中只要抽提到总 DNA 就可进行 AFLP 分析。3）重复性高，结果可靠。与 RAPD 相比，AFLP 对基因组的扩增是在强制基础上的选择性扩增，是双引物扩增酶切片段，扩增是在较高的退火温度下（如 56℃）进行的，扩增结果重复性较好，AFLP 标记实验室之间的重复率可以在 99.4% 以上，类似于微卫星的重复率（Jones，1997）。RAPD 扩增对模板浓度是较敏感的，而 AFLP 对模板的浓度是不敏感的，在很大浓度范围内扩增结果没有变化，再者 AFLP 引物与模板的错配和产物的统计错误都大大低于 RAPD，因此 AFLP 重复性和可靠性都比 RAPD 等随机引物扩增技术要高，可以预见 AFLP 可能会取代 RAPD 等随机引物扩增技术应用在生物

遗传进化方面的研究中。4）AFLP 具有较高的分辨率。通过引物的组合可以扩增出许多产物，例如在复杂基因组中，两种内切酶每次组合就能够扩增 10 万条带，而每一个 AFLP 反应仅选择其中的 50～100 条带进行扩增。这些 AFLP 标记中至少有部分标记位于变异的区域，因此可以展示种群内微小的遗传变异，并可以用测序凝胶来区分 AFLP 扩增带间的单个核苷酸的差异。5）AFLP 可以获得高密度的标记，而且少部分 AFLP 标记（占 4%～15%）是共显性的，与其它遗传标记例如 RFLP 和 SSR 相比，AFLP 具有最高的信息含量（许占友等，2000），因此 AFLP 更适宜于遗传连锁图谱的构建。

但是 AFLP 也有其缺点。1）与 RAPD 等显性标记相似，AFLP 产生的标记多数是显性的，因此不能区分某一位点是杂合体还是纯合体。与共显性标记相比，不能更好地估算种群遗传的变异，对种群遗传结构的分析不能提供更多的统计信息。在分析自然种群遗传结构时，AFLP 假定 AFLP 位点都处于 Hardy-Weinberg 平衡，但此假定常是站不住脚的，实际上有些 AFLP 位点是不处于 Hardy-Weinberg 平衡（Yan *et al*.，1999），用这些位点来估算种群遗传变异就会得到较大的误差。2）从技术上，与 RAPD 相比，仍然是比较复杂，需要酶切、接头连接、预扩增和扩增等几个步骤，试验操作技术要求较高，经常使用对人体有害的放射性同位素来检测产物。3）当个体之间的序列同源性低于 90% 时，AFLP 将会在个体之间得到很少相同的带，因此 AFLP 不适宜于亲缘关系很远的物种，一般来说 AFLP 适于种下的研究。而在个体之间同源性很高时，只有极少的序列存在变异，AFLP 仍然不能检测到这些序列的差异。4）在进行 AFLP 分析时，对基因组 DNA 的质量有较高的要求，不能含内切酶的抑制剂，因为基因组 DNA 需要完全酶切，这也是 AFLP 分析的先决条件，如果酶切和连接不完全可能会扩增出被认为是多态性的带，导致错误的分析结果。在消化时间足够长的情况下，基因组 DNA 酶切不完全可能是基因组 DNA 中含有酶的抑制剂例如残留酚、多糖等。

3 对 AFLP 技术的改进和发展

为了尽可能地克服 AFLP 的缺点，人们又对 AFLP 技术进行了某些改进，例如不使用同位素（Chalhoub *et al*.，1997；Roma *et al*.，1999；Lin *et al*.，1999），对某些步骤进行增减等（Suazo *et al*.，1999；Ranamukhaarachchi *et al*.，2000）。同时人们又以 AFLP 为基础，发展了许多相关的技术，这些技术主要有以下几个。

扩增片段长度随机多态性（amplified fragment random polymorphism，AFRP）（Arencidia *et al*.，1998），AFRP 利用一个 AFLP 选择引物和一个随机引物进行扩增。为了提高 AFLP 共显性标记的比例，人们又发明了其它技术例如微卫星 AFLP 或者称为选择扩增的微卫星多态 DNA（selective amplification of microsatellite polymorphic DNA，SAMPL）（Witsenboer *et al*.，1997）。此技术与 AFLP 相似，使用的模板是 AFLP 预扩增的产物。但在第二次扩增中使用一个与 AFLP 不同的引物，即 SAMPL 引物，SAMPL 引物是根据植物中复合微卫星序列而设计的。引物含有混合微卫星序列（含有两个短小重复序列），每个重复序列有两个核苷酸组成，整个引物长度为 18～20 个核苷酸，并用放射性同位素标记。放射性标记的 SAMPL 引物与复合微卫星的连接区域序列互补，因此可以在不知道微卫星侧翼序列的情况下扩增模板 DNA 中微卫星位点，扩增的片段是从 SAMPL 引物到 AFLP 引物之间的片段，此片段中含有微卫星序列。由于 SAMPL 技术可以扩增微卫星位点，从而增加了共显性标记的比例。

应用在动物中的类似技术是直接扩增长度多态性（direct amplification of length polymorphisms，DALP），DALP 不需要酶切连接等步骤，扩增是用 M13 测序通用引物，只是正向引物的 5′端共有 M13 序列还在其 3′端加 2～4 个核苷酸的选择序列，反向引物是 M13 测序引物，扩增也是分两步，第 2 次扩增与第 1 次不同在于使用的引物不同。DALP 的产物可以直接测序，通过比较扩增产物的有无、片段大小来研究动物的进化（Desmarais *et al*.，1998）。

序列特征扩增（sequence characterized amplified regions，SCARs）（Paran *et al*.，1993）最初是在 RAPD 的基础上发展起来的，其基本步骤是先进行 RAPD 分析，然后把遗传的 RAPD 片段（与目的基因连锁的 RAPD 片段）进行纯化、克隆和测序；根据 RAPD 片段两末端的序列设计特殊位点引物，再进行 PCR 特异扩增，这样可以把与原 RAPD 片段相对应的单一位点鉴定出来，此位点就称为 SCAR。

SCAR 比 RAPD 有更高的重复性，标记是共显性的。SCAR 主要缺点是如果仅仅是由于引物结合位点处某个或一些核苷酸的错配而导致某些 RAPD 带的多态性，而这些多态性的带除在引物结合位点外其余部分序列没有差异，那么选择这些带进行 SCAR 分析时，可能得到没有差异的结果。由于 AFLP 同 RAPD 一样都是显性标记，因此 AFLP 也可以进行 SCAR 研究（Xu *et al*.，2001）。

TE-AFLP 技术（three endonuclease-AFLP）是用三种而不是两种内切酶（van Der Wurff *et al*.，2000）。基因组 DNA 酶切后，加入接头连接，但不提供与密切酶互补的的接头。由于加入了第 3 种酶使得 AFLP 降低了带数，具有更高的分辨率，对研究复杂的基因组更加方便。同时 TE-AFLP 分析可以减少试验时间，降低试验费用。

对于 AFLP 相关技术的发展，相信随着分子生物学技术的进步，人们会不断地推出以 AFLP 技术为基础的其它标记，最大限度地克服其缺点，充分发挥其优点。

4 AFLP 与其它标记某些特点的比较

AFLP 与多位点随机扩增图谱（multiple arbitrary amplicon profiling，MAAP，包括 RAPD、DAF、AP-PCR 三种技术）、微卫星、RFLP、等位酶技术以及 DNA 序列分析相比，各具有优缺点，这些技术的优缺点可以简单地总结如表 1（Mueller *et al*.，1999；Karp，1997）。

表 1 几种常用分子遗传标记的主要特点比较

Table 1 Comparison of the main features of several common molecular genetic markers

	AFLP	MAAP	微卫星 SSR	RFLP	等位酶 Allozyme	序列分析 Sequencing
获得变异信息的数量 quantity of information	高 high	高 high	高 high	高 high	低 low	以序列而定，中-低 medium-low，sequence dependent
重复性 replicability	高 high	低，可变 low，variable	高 high	高 high	高 high	高 high
对遗传变异的分辨率 resolution of genetic differences	高 high	中等 medium	高 high	高 high	中等 medium	最高 highest
操作的简易性 ease of use and development	中等 medium	简易 easy	困难 difficult	困难 difficult	简易 easy	困难 difficult
获得标记的时间 development time	短 short	短 short	长 long	长 long	短 short	长 long
标记显性特点 dominant or codominant	显性，较少部分是共显性 dominant，some are codominant	显性，很少数是共显性 dominant，few are codominant	共显性 codominant	共显性 codominant	共显性 codominant	共显性 codominant
起步费用 development costs per sample	低 low	低 low	高 high	中 medium	低 low	高 high
每样本的试验费用 running costs per sample（$ per sample）	中 medium（1.5）	低 low（1）	低 low（1）	高 high（2）	很低 very low（0.2）	高 high（2）
每天可以分析的样本数 samples per day	50	50	50	20	50	20
对样本的杀戮水平 level of kill required	中 medium	低 low	低-中 low-medium	低 low	高 high	高 high
自动化水平 automation	高 high	高 high	高 high	困难 difficult	困难 difficult	高 high
同位素应用 radioactivity necessary	是/否 yes/no	否 no	是/否 yes/no	是/否 yes/no	否 no	是/否 yes/no

5 AFLP技术在昆虫学研究中的应用

目前AFLP技术在昆虫中的应用还不是很多。主要用于以下几个研究领域。

（1）生态型的鉴定：McMichael等（1999）应用AFLP技术对行军虫 *Spodoptera frugiperda* 两个寄主生态型进行鉴定，他们用5对引物进行AFLP扩增。在74个个体中，发现28个不同的位点，在两型的所有个体之间没有共同的带，即这28个位点都是多态的。从水稻采集的个体比从玉米采集的个体表现更大的AFLP变异。用其中10个位点的差异进行聚类分析，发现两个生态型的个体基本各自聚在一起，AFLP得到的结果与等位酶和mtDNA的基本相似。

盖宇（1999）用AFLP技术对粉虱寄生蜂丽蚜小蜂的Beltsville和Kopoert品系进行了鉴别，发现在AFLP谱带中，尽管有11条特异于Beltsville品系、1条谱带特异于Koppert品系，但是两个品系的遗传相似性大于99.9%，两个品系之间的遗传多样性很低。他们把对两个品系特异的AFLP带经过回收测序设计引物（SCAR分析），但结果是在两个品系中都能扩增出产物。

Cervera等（2000）对粉虱（*Bemisia*）3个种和9个参考生物型的13个种群进行了AFLP研究，共得到354条多态带，结果表明 *B. tabaci* 的生物型可以聚类在一起，聚类形成4个分支，其间的最小相似性指数为0.32，而与其它的两个种的相似系数是0.07。此结果与以前RAPD所得的结果相似。

（2）种群遗传学的研究：Yan等（1999）为了验证显性AFLP标记是否能够对按蚊种群遗传变异提供更准确数据，对用RFLP标记和AFLP标记获得的数据参数进行了比较研究，AFLP用5个引物组合得到137个位点。AFLP得到的异质度（heterozygosity）和种群间遗传分化系数（Fst）都与RFLP有所不同。试验证明部分RFLP位点不处于Hardy-Weinberg平衡，因此也意味着对用于分析按蚊种群的某些AFLP位点由于其前提假设不可靠而使得到的分析结果不准确。

Forneck（2000）对葡萄根瘤蚜的103个欧洲和9个北美的种群进行了AFLP分析。这些种群聚类成两个分支，大体上与地理位置相关。北纬43°以北地区种群与43°以南的种群在异质度上有显著的不同，反映出南北地区种群的生殖方式的不同。寄主植物对欧洲根瘤蚜的种群遗传结构没有影响。

（3）连锁图谱的构建：由于AFLP可以提供最高的信息含量，因此AFLP非常适于构建物种的连锁图谱。Tan等（2001）用AFLP技术对家蚕的连锁遗传图谱进行了构建。他们用35个引物组合获得了1 248（60.7%）条多态带，其中545个多态标记按照1:1在后代分离，而356个按照1:1分离的标记分配到30个连锁组，长度在37.4～691.0 cM。用AFLP得到的连锁图谱总长度为6 512 cM。

6 展望

由于AFLP技术的许多优点，使它可能取代部分常规的分子遗传标记在种群遗传研究中的应用。例如AFLP具有很高的重复性，在种群遗传研究中它可以取代RAPD技术；在技术操作方面由于其简易性，在构建遗传图谱和种群分化等的某些研究中可以部分地取代其它高分辨率的分子遗传标记例如微卫星、RFLP等。但是与共显性遗传标记微卫星、等位酶相比，由于AFLP的缺陷，它不可能更准确地对种群遗传变异进行分析。因此AFLP技术与微卫星标记以及DNA序列分析结合起来才能成为种群遗传变异研究中的主要工具。

AFLP作为新兴的一种分子标记技术，并非十全十美，例如使用同位素，对环境和试验者人身构成一定的威胁，其试验成本也比较高，但是它是在不断完善和发展的，例如使用非同位素或者银染技术代替同位素，简化操作步骤，与其它技术相结合，以取得更好的结果。相信随着AFLP技术的不断完善，发展成常规的分子标记技术，并越来越广泛地利用在昆虫的分类、系统发育和种群遗传等研究中。

参 考 文 献 （References）

Arencibia A, Gentinetta E, Cuzzoni E, Castiglione S, Kohli A, Vain P, Leech M, Christou P, Sala F, 1998. Molecular analysis of the genome of transgenic rice (*Oryza satira* L.) plants produced via particle bombardment or intact cell electroporation. *Mol. Breed*, 4 (2): 99－109.

Cervera M T, Cabezas J A, Simon B, Martinez-Zapater J M, Beitia F, Cenis J L, 2000. Genetic relationships among biotypes of *Bemisia tabaci* (Hemiptera: Aleyrodidae) based on AFLP analysis. *Bull. Entomol. Res.*, 90 (5): 391－396.

Chalhoub B A, Thibault S, Laucou V, Rameau C, Hofte H, Cousin R, 1997. Silver staining and recovery of AFLP amplification products on large denaturing polyacrylamide gels. *Biotechniques*, 22 (2): 216－

220.

Desmarais E, Lanneluc I, Lagnel J, 1998. Direct amplification of length polymorphisms (DALP), or how to get and characterize new genetic markers in many species. *Nucleic Acids Res.*, 26 (6): 1 458 – 1 465.

Forneck A, Walker M A, Blaich R, 2000. Genetic structure of an introduced pest, grape phylloxera (*Daktulosphaira vitifoliae* Fitch), in Europe. *Genome*, 43 (4): 669 – 678.

Gai Y, 1999. Molecular ecology approach to different strains of the whitefly parasitoid, *Encarsia formosa*. PhD Dissertation of Beijing Normal University. [盖宇，1999. 粉虱拟寄生蜂丽蚜小蜂不同品系的分子生态学研究. 北京师范大学博士论文]

Jones C J, 1997. Reproducibility testing of RAPD, AFLP and SSR markers in plants by a network of European laboratories. *Mol. Breed*, 3: 381 – 390.

Karp A, Edwards K J, 1997. DNA markers: a global overview. In: Caetano-Anolles G, Gresshoff P M eds. DNA Markers: Protocols, Applications, and Overviews. Wiley-Liss. 1 – 13.

Lin J J, Ma J, Kuo J, 1999. Chemiluminescent detection of AFLP markers. *Biotechniques*, 26 (2): 344 – 348.

Loxdale H D, Lushai G, 1998. Molecular markers in entomology. *Bulletin Entomol. Res.*, 88: 577 – 600.

McMichael M, Prowell D P, 1999. Differences in amplified fragment-length polymorphisms in fall armyworm (Lepidoptera: Noctudiae) host strains. *Ann. Entomol. Soc. Amer.*, 92: 175 – 181.

Mueller U G, Wolfenbarger L L, 1999. AFLP genotyping and fingerprinting. *Trends Ecol. Evol.*, 14 (10): 389 – 394.

Ranamukhaarachchi D G, Kane M E, Guy C L, Li Q B, 2000. Modified AFLP technique for rapid genetic characterization in plants. *Biotechniques*, 29 (4): 858 – 859.

Roman B L, Pham V N, Bennett P E, Weinstein B M, 1999. Non-radioisotopic AFLP method using PCR primers fluorescently labeled with Cy5. *Biotechniques*, 26 (2): 236 – 238.

Suazo A, Hall H G, 1999. Modification of the AFLP protocol applied to honey bee (*Apis mellifera* L.) DNA. *Biotechniques*, 26 (4): 704 – 705.

Tan Y D, Wan C, Zhu Y, Lu C, Xiang Z, Deng H W, 2001. An amplified fragment length polymorphism map of the silkworm. *Genetics*, 157 (3): 1 277 – 1 284.

van Der Wurff A W, Chan Y L, van Straalen N M, Schouten J, 2000. TE-AFLP: combining rapidity and robustness in DNA fingerprinting. *Nucleic Acids Res.*, 28 (24): E105.

Vos P, Hogers R, Bleeker M, Reijans M, van de Lee T, Homes M, Frijters A, Pot J, Peleman J, Kuiper M, Zabeau M, 1995. AFLP: a new technique for DNA fingerprinting. *Nucleic Acids Res.*, 23 (21): 4 407 – 4 414.

Vos P, Kuiper M, 1997. AFLP analysis. In: Caetano-Anolles G, Gresshoff P M eds. DNA Markers: Protocol, Applications and Overviews. Wiley. 115 – 131.

Witsenboer H, Vogel J, Michelmore R W, 1997. Identification, genetic localization, and allelic diversity of selectively amplified microsatellite polymorphic loci in lettuce and wild relatives (*Lactuca* spp.). *Genome*, 40 (6): 923 – 936.

Xu M, Huaracha E, Korban S S, 2001. Development of sequence-characterized amplified regions (SCARs) from amplified fragment length polymorphism (AFLP) markers tightly linked to the *Vf* gene in apple. *Genome*, 44 (1): 63 – 70.

Xu Z Y, Chang R Z, Qiu L J, Li X H, 2000. Comparison of the different DNA molecular markers on the polymorphic information content. *J. Plant Genetic Resources*, 4 (1): 41 – 46. [许占友，常汝镇，邱丽娟，李向华，2000. 不同 DNA 分子遗传标记信息量比较. 植物遗传资源科学，4 (1): 41 – 46]

Yan G, Romero-Severson J, Walton M, Chadee D D, Severson D W, 1999. Population genetics of the yellow fever mosquito in Trinidad: comparisons of amplified fragment length polymorphism (AFLP) and restriction fragment length polymorphism (RFLP) markers. *Mol. Ecol.*, 8 (6): 951 – 963.

Zabeau M, Vos P, 1993. Selective restriction fragment amplification: a general method for DNA fingerprinting. European patent application, publication no. EP 0534858.